NT-proBNP

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF NT-proBNP IN HUMAN SERUM
CAT. NO. SK-1204 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYME IMMUNOASSAY FÜR DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON NT-proBNP IN HUMANEN SERUM PROBEN
KAT. NR. SK-1204 12 X 8 TESTE

(FR) KIT DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN NT-proBNP DANS LE SERUM HUMAIN
REF. SK-1204 12 X 8 TESTS

(IT) SAGGIO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI NT-proBNP NEL SIERO UMANI
CODICE. SK-1204 12 X 8 DERMINAZIONI

CE

BIOMEDICA

rev.no. 150318 (replacing 141021)
Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.com

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO

ENGLISH	3
DEUTSCH	7
FRANCAIS	10
ITALIANO	13

Additional information on our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.
Pour toute information complémentaire sur nos produits, visiter notre site Internet.
Ulteriori informazioni sui nostri prodotti sono disponibili sulla nostra home page.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

BNP is mainly expressed by ventricular myocardium in response to volume overload and increased filling pressure. BNP has a cleavable signal sequence. Mature BNP consists of 108 amino acids (proBNP or BNP-108), and undergoes cleavage resulting in physiologically active BNP-32 and additional C-terminal fragments (cf. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_0000001532), along with a physiologically inactive N-terminal peptide comprising amino acids 1-76, which is further degraded proteolytically.

BNP has a key role in cardiovascular homeostasis with biological actions including natriuresis, diuresis, vasorelaxation, and inhibition of renin and aldosterone secretion. A high concentration of BNP in the bloodstream is indicative of heart failure.

Areas of Interest

- Cardiac impairment, acute myocardial infarction, (left ventricular dysfunction)
- Renal failure
- Obesity and diabetes
- Various forms of secondary hypertensions
- Therapy monitoring of heart failure patients

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	polyclonal sheep anti NT-proBNP antibody coated microtiter strips in stripholder packed in alu bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer, 20x concentrated , clear cap	1 x 50 ml
STD	Standards, synthetic human NT-proBNP (0/10/40/160/640 pmol/l), lyophilised, white caps	5 vials lyophilised
CTRL	Control, synthetic human NT-proBNP, lyophilised, yellow cap, exact concentration after reconstitution see label	1 vial lyophilised
CONJ	Conjugate, (sheep anti human NT-proBNP-HRPO), red dye, brown cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, sulphuric acid, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 1 self-adhesive plastic film
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50-500 µl and disposable tips
- ELISA reader for absorbance at 450 nm (or from 450 nm to 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results
- Plate washer is recommended for washing
- Distilled or deionised water

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation:

NT-proBNP is stable in whole blood for several hours at room temperature (18-26°C). Nevertheless we recommend separating serum by centrifugation as soon as possible, e.g. 20 min at 2,000 x g, preferably at 4°C (2-8°C). Serum can be stored at 4°C (2-8°C) up to two days. For long term storage, aliquot the acquired serum samples and store them at -25°C or lower. Samples can be subjected to 5 freeze-thaw cycles without any loss of immune reactivity. Lipemic or hemolyzed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. Samples with values above STD5 (640 pmol/l) can be diluted with STD1 or NT-proBNP negative human serum.

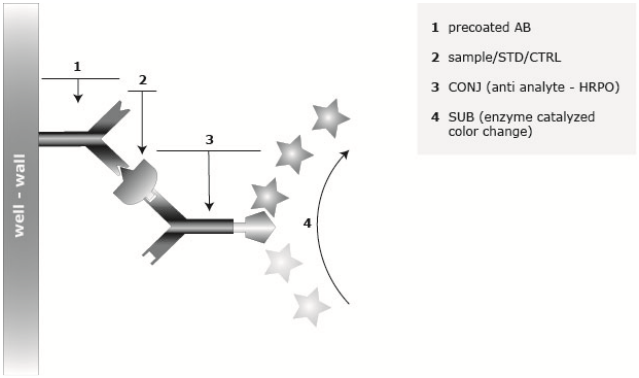
For further information on sample stability and assay performance characteristics please visit our website www.bmgrp.com (s. Validation Data) or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution/Handling:

- STD (Standard): Pipette 500 µl of distilled or deionised water into each vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 10 min. Swirl gently. The standard concentration is printed on the label. Reconstituted standard is stable at -25°C until expiry date. Avoid freeze-thaw cycles.
- CTRL (Control): Pipette 500 µl of distilled or deionised water to the vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 10 min. Swirl gently. The final concentration is stated on the label. Reconstituted control is stable at -25°C until expiry date stated on label. Avoid freeze-thaw cycles.
- WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature (18-26°C). The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) up to one month. Use only diluted WASHBUF (Wash buffer) for the assay.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the determination of NT-proBNP in human serum.
In a first step, sample and conjugate (sheep anti human NT-proBNP-HRPO) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with polyclonal sheep anti NT-proBNP antibody. NT-proBNP present in the sample binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the detection antibody. In the washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed colour change of the substrate is directly proportional to the amount of NT-proBNP present in the sample. This colour change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader.



7) ASSAY PROTOCOL

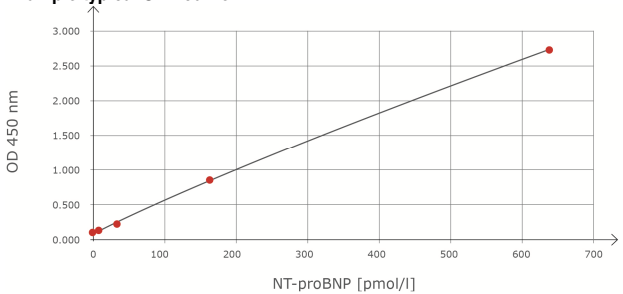
All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.
Mark position for STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.
Take microtiter strips out of the alu bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

1. Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) in duplicate into respective well.
2. Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well, swirl gently.
3. Cover tightly and incubate 3 hours at room temperature (18-26°C).
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the last wash.
5. Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
6. Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.
7. Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
8. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user.
Samples with values above STD5 (640 pmol/l) can be diluted with STD1 or NT-proBNP negative human serum and re-assayed. Dilution factors must be taken into consideration for calculation of the sample concentrations.

Example typical STD-curve:



The quality control (QC) protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit at production date. Data for OD obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for STD5 and the value of the CTRL is in range (target range see label).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Values of apparently healthy individuals:	Median (serum, n = 93): 3.0 pmol/l Each laboratory should establish its own reference data.
Conversion factor pmol/l to pg/ml	1 pmol/l = 8.475 pg/ml refers to NT-proBNP (1-76) that is detected by the ELISA
Standard range:	0 to 640 pmol/l
Sample volume:	50 µl human serum
Detection Limit:	(0 pmol/l + 3 SD) 3 pmol/l
Incubation time:	3 hours / 30 min

10) PRECISION

Experiment:
Intra-assay: 2 samples of known concentrations were tested 3 times in 1 assay by 1 operator.
Inter-assay: 2 samples of known concentrations were tested 8 times in 2 assays by different operators.

Intra-assay (n=3)	**Sample 1**	**Sample 2**	**Inter-assay (n=8)**	**Sample 1**	**Sample 2**
Mean (pmol/l)	60.2	35.2	Mean (pmol/l)	52.1	108.1
SD (pmol/l)	2.0	0.9	SD (pmol/l)	1.7	7.9
CV (%)	4	3	CV (%)	3	7

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or various lots.
- Do not use reagents beyond expiration date. Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab and HBsAg, and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious. Liquid reagents contain ≤0.1% Proclin 300 as preservative, which is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs.

13) LITERATURE

1. Utility of the Amino-Terminal Fragment of Pro Brain Natriuretic Peptide in Plasma. For the Evaluation of Cardiac Dysfunction in elderly Patients in Primary Health Care. Alehagen U et al., Clin Chem, 49:8; 1337-1346 (2003).
2. Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. Hammerer-Lercher et al., Clin Chim Acta, 310(2),193-197 (2001).
3. Prognostic evaluation of neurohumoral plasma levels before and during beta-blocker therapy in advanced left ventricular dysfunction. Stanek B. et al., JACC, 38, 436-442 (2001).
4. Pulmonary arterial hypertension in rheumatic mitral stenosis: does it affect right ventricular function and outcome after mitral valve replacement? Pande S et al., Interact CardioVasc Thorac Surg, 9: 421-425 (2009).
5. Prognostic impact of body mass index in patients undergoing coronary artery bypass surgery. Sung SH et al., Heart, 97: 648-654 (2011).
6. Effect of piboserod, a 5-HT4 serotonin receptor antagonist, on left ventricular function in patients with symptomatic heart failure. Kjekshus JK et al., Eur J Heart Fail, 11: 771-778 (2009).
7. Plasma pro-B-type natriuretic peptide in the general population: screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction. Goetze JP et al., Eur Heart J, 27: 3004-3010 (2006).

1) EINLEITUNG

BNP wird hauptsächlich durch Myokard als Reaktion auf Volumenüberladung und erhöhtem Fülldruck synthetisiert. Reifes BNP besteht nach Verlust der Signalsequenz aus 108 Aminosäuren (proBNP oder BNP-108). Es wird in das physiologisch aktive BNP-32, weitere C-terminale Fragmente (vgl. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_0000001532), sowie ein physiologisch inaktives N-terminales Peptid aus Aminosäuren 1-76 gespalten, das weiter proteolytisch abgebaut wird. Die BNP-Fragmente in der Zirkulation sind daher sehr heterogen.

BNP spielt eine Schlüsselrolle in der kardiovaskulären Homöostase mit biologischen Wirkungen einschließlich Natriurese, Diurese, Vasorelaxation, und der Hemmung von Renin und Aldosteron-Sekretion. Eine hohe Konzentration von BNP im Blut ist ein Hinweis auf Herzinsuffizienz.

Interessensgebiete:

- Herzinsuffizienz, akuter Myokardinfarkt (linksventrikuläre Dysfunktion)
- Niereninsuffizienz
- Adipositas und Diabetes
- Verschiedene Formen der sekundären Hypertonie
- Therapiebeobachtung von Patienten mit Herzinsuffizienz

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Polyklonaler Schaf anti NT-proBNP Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminium Beutel mit Trockenmittel	12 x 8 Teste
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Verschluß	1 x 50 ml
STD	Standard, synthetisches humanes NT-proBNP (0, 10, 40, 160, 640 pmol/l), weißer Verschluß, lyophilisiert,	5 Fläschchen,
CTRL	Kontrolle, synthetisches humanes NT-proBNP, gelber Verschluß, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	1 Fläschchen,
CONJ	Konjugat, (Schaf anti human NT-proBNP-HRPO), rot gefärbt, brauner Verschluß, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), blauer Verschluß, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung, H_2SO_4, weißer Verschluß, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 1 selbstklebende Aluminium-Abdeckfolie
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50-500 µl inkl. Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) stabil.

Probenvorbereitung:

NT-proBNP ist im Vollblut für einige Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) stabil. Dennoch empfehlen wir die Serumseparation durch Zentrifugation sobald wie möglich durchzuführen, z.B. 20 min bei 2000 x g, vorzugsweise bei 4°C (2-8°C). Serum kann bis zu 2 Tage bei 4°C (2-8°C) aufbewahrt werden. Die gewonnenen Serumproben sollten aliquotiert und bei -25°C oder niederer für längerfristige Lagerung aufbewahrt werden. Fünf Frier/Tau Zyklen verursachen keine Verluste der Immunreaktivität in den Proben. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmungen. Proben mit Werten über STD5 (640 pml/l)

können mit STD1 oder NT-proBNP negativem human Serum verdünnt werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website www.bmgrp.com (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an export@bmgrp.com oder Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution/Handhabung:

- STD (Standard): Pipettieren Sie 500 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser in jeden Standard. Lassen Sie das Lyophilisat bei Raumtemperatur (18-26°C) 10 Minuten lösen. Gut mischen. Genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett. Der rekonstituierte Standard ist bei -25°C oder niederer bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Frier/Tau Zyklen.
- CTRL (Kontrolle): Pipettieren Sie 500 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser in die Kontrolle. Lassen Sie das Lyophilisat bei Raumtemperatur (18-26°C) 10 Minuten lösen. Gut mischen. Genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett. Die rekonstituierte Kontrolle ist bei -25°C oder niederer bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Frier/Tau Zyklen.
- WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 (1+19) verdünnt, zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser. Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Der unverdünnte WASHBUF ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte WASHBUF ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF verwendet werden.

6) TESTPRINZIP

Siehe Kapitel *6) PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.
Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokollblatt.
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel bei 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1. Pipettieren Sie 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die entsprechenden Wells.
2. Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells.
3. Streifen abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.
4. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünnten WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5. Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat) in alle Wells.
6. 30 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
7. Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells, gut mischen.
8. Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mit einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Proben mit Ergebnissen über dem höchsten Standard (STD5, 640 pmol/l) können mit STD1 oder niedrig messendem Serum verdünnt und erneut getestet werden. Eventuelle weitere Verdünnungen müssen bei der Berechnung der Probenwerte berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel *8) CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

Auf dem beigepackten QC Protokoll sind die Resultate der QC Freigabe der jeweiligen Kit Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD5 den Wert 1,50 oder höher erreicht und der Wert der CTRL im gültigen Bereich ist (Bereich siehe Etikett).

9) TESTMERKMALE

Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median (Serum, n= 93): 3,0 pmol/l Jeder Verwender sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren.
Umrechnungsfaktor pmol/l zu pg/ml:	1 pmol/l = 8,475 pg/ml entspricht NT-proBNP (1-76)
Standardbereich:	0 bis 640 pmol/l
Probenvolumen:	50 µl human Serum
Detektionsgrenze:	(0 pmol/l + 3 SD) 3 pmol/l
Inkubationszeiten:	3 h / 30 min

10) PRÄZISION

Experiment:
Intra-assay: 2 Proben wurden 3 Mal in Doppelbestimmung in 1 Test von 1 Operator getestet.
Inter-assay: 2 Proben wurden 8 Mal in Doppelbestimmung in 2 Tests von unterschiedlichen Operatoren getestet.

Intra-assay (n=3)	**Probe 1**	**Probe 2**	**Inter-assay (n=8)**	**Probe 1**	**Probe 2**
Durchschnitt (pmol/l)	60,2	35,2	Durchschnitt (pmol/l)	52,1	108,1
SD (pmol/l)	2,0	0,9	SD (pmol/l)	1,7	7,9
VK (%)	4	3	VK (%)	3	7

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIVAk und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.
Die flüssigen Reagenzien enthalten ≤ 0,1% Proclin 300 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrille und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel *13) LITERATURE* im englischen Teil des Beipacktextes.

1) INTRODUCTION

BNP est principalement exprimé par le myocarde ventriculaire en réponse à la surcharge de volume et augmentation de la pression de remplissage. BNP possède une séquence signal clivable.
BNP mature est constituée de 108 acides aminés (proBNP ou BNP-108), et subit un clivage résultant de l'activité physiologique de BNP-32 et des fragments supplémentaires C-terminaux (cf. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860 # PRO_0000001532), et aussi d'un peptide N-terminal physiologiquement inactif comprenant les acides aminés 1 à 76, qui est ensuite dégradé par protéolyse. BNP a un rôle clé dans l'homéostasie cardiovasculaire avec des actions biologiques, y compris la natriurèse, la diurèse, vasorelaxation, et l'inhibition de la rénine et la sécrétion d'aldostérone. Une forte concentration de BNP dans le sang est indicatif d'une insuffisance cardiaque.

Domaines d'intérêts:

- Insuffisance cardiaque, infarctus aigu du myocarde (dysfonctionnement ventricule gauche)
- Insuffisance rénale
- L'obésité et le diabète
- Différentes formes d'hypertensions secondaires
- Le suivi de la thérapie de patients souffrant d'insuffisance cardiaque

2) CONTENU DU KIT

COMPOSANTS	COMPOSITION DU KIT	QUANTITE
PLATE	PLAQUE: Anticorps polyclonaux de mouton anti-NT-proBNP coatés sur les barrettes de la microplaque de support emballés dans un sac en aluminium avec du déshydratant	12 x 8 tests
WASHBUF	WASHBUF: Tampon de lavage, concentré 20 fois, capuchon transparent	1 x 50 ml
STD	STANDARD (MST): NT-proBNP humaine synthétique (0, 10, 40, 160, 640 pmol/l), lyophilisées, capuchon blancs	5 flacons
CTRL	CONTRÔLE: NT-proBNP humaine synthétique, lyophilisée, capuchon jaune, voir la concentration exacte après reconstitution sur l'étiquette	1 flacon
CONJ	CONJUGUE: Anticorps de mouton anti-NT-proBNP-HRPO humaine, colorant rouge, capuchon brun, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
SUB	SUBSTRAT: Solution de TMB, capuchon bleu, prête à l'emploi	1 x 22 ml
STOP	Solution d'acide sulfurique, capuchon blanc, prête à l'emploi	1 x 7 ml

3) MATERIEL ADDITIONNEL CONTENU DANS LE KIT

- 1 film plastique auto-adhésif
- Protocole de contrôle qualité
- Feuille de protocole
- Mode d'emploi

4) MATÉRIEL ET ÉQUIPMENT REQUIS

- Pipettes de précision étalonnées pour délivrer 50-500 µl et embouts jetables
- Un lecteur de plaque ELISA absorbance à 450 nm (ou de 450 nm à 630 nm)
- Papier millimétré ou logiciel pour le calcul des résultats
- Une laveuse de plaque est recommandée pour le lavage
- Eau distillée ou déminéralisée

5) REACTIFS ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Tous les réactifs du kit sont stables à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque flacon.

Préparation de l'échantillon:

NT-proBNP est stable dans le sang entier pendant plusieurs heures à température ambiante (18-26°C). Néanmoins, nous recommandons le sérum de séparation par centrifugation aussi rapidement que possible, par exemple, 20 min à 2000 x g, de préférence à 4°C (2-8°C). Le sérum peut être stockés à 4°C (2-8°C) jusqu'à deux jours.
Pour le stockage à long terme, aliquoter les échantillons de sérum acquis et stocker les à -25°C ou moins. Les échantillons peuvent être soumis à 5 cycles de congélation-décongélation sans perte de réactivité immunitaire. Les échantillons lipémiques ou hémolysés peuvent donner des résultats erronés.

Les échantillons doivent être mélangés avant le dosage.

Nous vous recommandons de réaliser deux essais pour toutes les valeurs. Les échantillons avec des teneurs supérieures de MST5 (640 pmol/l) peuvent être dilués avec la solution de MST1 ou le sérum NT-proBNP humain négatif.
Pour de plus amples informations sur les caractéristiques de performance, de stabilité et d'analyse de l'échantillon merci de visiter notre site Web www.bmgrp.com (v Validation Data) ou de contacter notre service client par e-mail export@bmgrp.com ou par téléphone +43 / 1 / 29107-45.

Reconstitution / manutention :

- STD (MST, Standard): Insérer à l'aide d'une pipette 500 µl d'eau distillée ou désionisée dans chaque flacon. Laisser à température ambiante (18-26°C) pendant 10 min. Agiter doucement. La concentration finale est indiquée sur l'étiquette. Le standard reconstitué est stable à -25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter les cycles de congélation-décongélation.
- CTRL (Control): Introduire à la pipette 500 µl d'eau distillée ou déminéralisée dans le flacon. Laisser à température ambiante (18-26°C) pendant 10 min. Agiter doucement. La concentration finale est indiquée sur l'étiquette. Le contrôle reconstitué est stable à -25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter les cycles de congélation-décongélation.
- WASHBUF (Tampon de lavage): Diluer le concentré au 01/20 (1+19), par exemple 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée. Les cristaux dans le concentré de tampon vont se dissoudre à température ambiante (18-26°C). Le tampon concentré reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette. Le tampon dilué reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à un mois. Utilisez uniquement cette solution de tampon de lavage diluée (WASHBUF) pour le dosage.

6) PRINCIPE DE L'ESSAI

Voir au chapitre *6) PRINCIPLE OF THE ASSAY* de la version anglaise de la notice.

7) ASSAY PROTOCOL

Tous les réactifs et les échantillons doivent être à température ambiante (18-26°C) avant utilisation dans le dosage.
Marquer les positions du Standard / Echantillon / Contrôle sur la feuille de protocole.
Sortez les barrettes de la microplaque du sac alu. Stocker les bandes inutilisées avec le déshydratant à 4°C (2-8°C) dans le sac en aluminium. Les bandes sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

1. Ajouter 50 µl de Standard / Echantillon / Contrôle en double exemplaire dans les puits respectifs.
2. Ajouter 200 µl de Conjugué dans chaque puit, agiter délicatement.
3. Couvrir hermétiquement la plaque et laisser incuber 3 heures à température ambiante (18-26°C).
4. Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de solution de tampon de lavage diluée (WASHBUF), retirez le reste de solution WASHBUF en tapant la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage.
5. Ajouter 200 µl de substrat dans chaque puit.
6. Incuber pendant 30 min à température ambiante (18-26°C) dans le noir.
7. Ajouter 50 µl de solution Stop dans chaque puit.
8. Mesurer l'absorbance immédiatement à 450 nm avec pour référence 630 nm si possible.

8) CALCUL DES RESULTATS

Lire la densité optique (DO) de chaque puits sur un lecteur de plaques à 450 nm (longueur d'onde de correction de 630 nm). Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs de DO des MST. (Utiliser un logiciel disponible dans le commerce ou du papier millimétré). On obtient ainsi la concentration de l'échantillon à partir de la courbe du standard. L'essai a été évalué à l'aide de l'algorithme 4 PL (4 paramètres logistiques).
Différentes méthodes d'ajustement de courbe doivent être évaluées par l'utilisateur. Les échantillons qui donnent les valeurs plus élevées que le dernier standard (MST5, 640 pmol/l) doivent être dilué avec MST1 ou un sérum négatif en NT-proBNP. Les facteurs de dilution doivent être pris en considération pour le calcul de concentration des échantillons.

Exemple de courbe de standard typique:
Voir au chapitre *8) CALCULATION OF RESULTS* dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le protocole de contrôle de qualité (QC) fourni avec le kit présente les résultats de la version finale de QC pour chaque kit à la date de production. Les données de densité optique obtenues par les clients peuvent différer en raison de diverses influences et/ou en raison de la diminution normale de l'intensité du signal pendant la durée de vie. Toutefois, cela n'affecte

pas la validité des résultats tant qu'une DO ≥ 1.50 est obtenue pour la MST de plus forte concentration et que la valeur du CTRL est dans la gamme (objectif réglable voir étiquette).

9) CHARACTÉRISTIQUES DE L'ESSAI

Données de référence:	Mediane (serum, n=93): 3.0 pmol/l Chaque laboratoire doit établir ses propres données de référence.
Facteur de conversion pmol/l en pg/ml:	1 pmol/l = 8,475 pg/ml se réfère à la NT-proBNP (1-76) qui est détectée par le test ELISA
Gamme du standard:	0 à 640 pmol/l
Volume de l'échantillon:	50 µl de sérum humain
Limite de détection:	(0 pmol/l + 3 SD) 3 pmol/l
Temps d'incubation:	3 heures / 30 min

10) PRÉCISION

Expérience:
Intra-essai: 2 échantillons de concentration connue ont été testés 3 fois dans 1 analyse par 1 opérateur.
Inter-dosage: 2 échantillons de concentrations connues ont été testés 8 fois dans 2 essais par différents opérateurs.

Intra-essai (n=3)	**Enchantillon 1**	**Enchantillon 2**	**Inter-dosage (n=8)**	**Enchantillon 1**	**Enchantillon 2**
Moyenne (pmol/l)	60.2	35.2	Moyenne (pmol/l)	52.1	108.1
SD (pmol/l)	2.0	0.9	SD (pmol/l)	1.7	7.9
CV (%)	4	3	CV (%)	3	7

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas mélanger ou échanger les réactifs d'autres lots ou sources.
- Ne pas mélanger les bouchons et capsules des différents réactifs ou entre plusieurs lots.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration. Protéger les réactifs de la lumière du soleil.
- La solution de substrat doit rester incolore jusqu'à son ajout dans la plaque.
- Pour garantir des résultats précis, une bonne adhérence de la plaque au support au cours des étapes d'incubation est nécessaire.

12) PRECAUTIONS

Tous les composants de test de source humaine ont été testés contre le VIH-Ab et HBsAg, et ont été trouvés négatifs. Néanmoins, ils doivent être manipulés et éliminés comme s'ils étaient des réactifs liquides infectieux qui contiennent ≤ 0,1% Proclin 300 comme conservateur, qui n'est pas toxique aux concentrations utilisées dans ce kit. Il peut provoquer des réactions allergiques de la peau - éviter le contact avec la peau ou les yeux.

- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ni appliquer de cosmétiques dans le laboratoire où les réactifs sont utilisés.
- Éviter tout contact avec les réactifs en utilisant des gants.
- L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Rincer avec de l'eau en cas de contact.

13) LITERATURE

Voir au chapitre *13) LITERATURE* dans la version anglaise de cette notice.

1) INTRODZIONE

Il BNP è principalmente espresso dal miocardio ventricolare in risposta a sovraccarico di volume ed aumento della pressione di riempimento. Il BNP ha una sequenza segnale sfaldabile. Il BNP maturo consiste di 108 amminoacidi (proBNP o BNP-108), e subisce una segmentazione risultante in BNP-32 fisiologicamente attivo e altri frammenti C-terminali (cf. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_0000001532), assieme ad un peptide N-terminale fisiologicamente non attivo, comprendente gli amminoacidi 1-76, che viene ulteriormente degradato proteoliticamente.

Il BNP ha un ruolo chiave nell'omeostasi cardiovascolare con azioni biologiche che comprendono natriuresi, diuresi, vasodilatazione e inibizione della secrezione di renina e aldosterone. Un'elevata concentrazione di BNP nel sangue è indicativa di insufficienza cardiaca.

Aree di Interesse

- Insufficienza cardiaca, infarto miocardico acuto, (disfunzione ventricolare)
- Insufficienza renale
- Obesità e diabete
- Varie forme di ipertensioni secondarie
- Monitoraggio della terapia sui pazienti con scompenso cardiaco

2) CONTENUTO DEL KIT

CONT	COMPONENTI DEL KIT	QUANTITA'
PLATE	Strisce di microtitolazione sensibilizzate con anticorpo policlonale di pecora anti NT-proBNP, fissate in una cornicetta e sigillate in una busta di alluminio con dessiccante	12 x 8 test
WASHBUF	Tampone di lavaggio, concentrato 20x, tappo trasparente	1 x 50 ml
STD	Standard di NT-proBNP sintetico umano (0, 10, 40, 160, 640 pmol/l), liofili, tappi bianchi	5 flaconi
CTRL	Controllo di NT-proBNP sintetico umano, liofilo, tappo giallo, vedere l'etichetta per conoscere l'esatta concentrazione dopo ricostituzione	1 flacone
CONJ	Coniugato, (anti human NT-proBNP-HRPO di pecora), colore rosso, tappo marrone, pronto per l'uso	1 x 22 ml
SUB	Substrato (soluzione di TMB), tappo blu, pronto per l'uso	1 x 22 ml
STOP	Soluzione di stop, acido solforico, tappo bianco, pronto per l'uso	1 x 7 ml

3) ALTRO MATERIALE AGGIUNTO AL KIT

- 1 pellicola di plastica autoadesiva
- Foglio del QC
- Schema del protocollo
- Manuale con le istruzioni d'uso

4) MATERIALE ED EQUIPAGGIAMENTO RICHIESTI MA NON FORNITI

- Micropipette calibrate per 50-500 µl e puntali monouso
- Lettore ELISA dotato di filtro a 450 nm (oppure a due filtri: 450 nm e 630 nm)
- Carta millimetrata oppure software per il calcolo dei risultati
- Si consiglia l'utilizzo di un Lavatore di micopiastre per i lavaggi
- Acqua distillata o deionizzata

5) PREPARAZIONE DEI REAGENTI E DEI CAMPIONI

Tutti i reagenti del kit sono stabili a 4°C (2-8°C) fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Preparazione del campione:

L'NT-proBNP è stabile nel sangue intero per diverse ore a temperatura ambiente (18-26°C). Tuttavia, si consiglia di separare per centrifugazione il siero il più presto possibile, es. 20 min a 2,000 x g, preferibilmente a 4°C (2-8°C). Il siero possono essere conservati a 4°C (2-8°C) fino a due giorni. Per la conservazione per periodi di tempo più lunghi, aliquotare i campioni di siero e conservarli a -25°C o a temperature inferiori. I campioni possono essere sottoposti a 5 cicli di congelamento-scongelamento senza alcuna perdita di reattività immunitaria. I campioni lipemici o emolizzati possono dare risultati errati. Mescolare bene i campioni prima di dosarli. Si raccomanda di misurare ciascun campione in duplicato. Diluire

con STD1 o siero umano negativo per NT-proBNP i campioni con concentrazione superiore allo standard più elevato (STD5, 640 pmol/l).

Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni e le caratteristiche prestazionali di questo kit, si prega di visitare il nostro sito web www.bmgrp.com (v Validation Data) o contattare il nostro servizio clienti per e-mail export@bmgrp.com o telefonicamente al numero +43/ 1/ 29107-45, oppure contattare il distributore locale.

Ricostituzione/Manipolazione:

- STD (Standard): Pipettare 500 µl di acqua distillata o deionizzata dentro ciascun flacone. Lasciare a temperatura ambiente (18-26°C) per 10 min. Agitare delicatamente. La concentrazione di ciascuno standard è stampata sull'etichetta del corrispondente flacone. Gli standard ricostituiti sono stabili a -25°C fino alla data di scadenza. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelameno.
- CTRL (Controllo): Pipettare 500 µl di acqua distillata o deionizzata dentro il flacone. Lasciare a temperatura ambiente (18-26°C) per 10 min. Agitare delicatamente. La concentrazione finale è riportata sull'etichetta del flacone. Il controllo ricostituito è stabile a -25°C fino alla data di scadenza dichiarata sull'etichetta. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento.
- WASHBUF (Tampone di lavaggio): Diluire 1:20 (1+19) la soluzione concentrate, es. 50 ml di WASHBUF + 950 ml di acqua distillata. I cristalli eventualmente presenti nel tampone concentrato si discioglieranno a temperatura ambiente (18-26°C). Il tampone concentrato è stabile a 4°C (2-8°C) fino alla data riportata sull'etichetta di flacone. Il tampone diluito è stabile a 4°C (2-8°C) per un mese. Usare solo WASHBUF diluito (Tampone di lavaggio) per il dosaggio.

6) PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Vedere capitolo *6) PRINCIPLE OF THE ASSAY* delle istruzioni d'uso in Inglese.

7) PROTOCOLLO DI DOSAGGIO

Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (18-26°C) prima di iniziare il dosaggio.
Contrassegnare la posizione per il STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Campione/Controllo) sullo schema del protocollo.
Prendere le strisce di microtitolazione dalla busta di alluminio. Conservare dentro la busta di alluminio le stisce non utilizzate con il dessiccante a 4°C (2-8°C). Le strisce sono stabili fino alla data di scadenza dichiarata sull'etichetta.

1. Aggiungere 50 µl di STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Campione/Controllo) in duplicato nei pozzetti corrispondenti.
2. Aggiungere 200 µl di CONJ (Coniugato) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
3. Coprire bene e incubare per 3 ore a temperatura ambiente (18-26°C).
4. Aspirare e lavare i pozzetti 5x con 300 µl di WASHBUF diluito (Tampone di lavaggio), rimuovere il WASHBUF restante picchiettando la piastra su un tovagliolo di carta dopo l'ultimo lavaggio.
5. Aggiungere 200 µl di SUB (Substrato) in tutti i pozzetti.
6. Incubare per 30 min a temperatura ambiente (18-26°C) al buio.
7. Aggiungere 50 µl di STOP (Soluzione di stop) in tutti i pozzetti.
8. Misurare subito l'assorbanza a 450 nm con riferimento a 630 nm, se disponibile.

8) CALCOLO DEI RISULTATI

Leggere la densità ottica (OD) di tutti i pozzetti su un lettore di micropiastre utilizzando la lunghezza d'onda di 450 nm (lunghezza d'onda di correzione di 630 nm). Costruire la curva di calibrazione dai valori OD degli STD. Usare un software disponibile in commercio o della carta millimetrata. Ricavare la concentrazione del campione da questa curva di calibrazione. Questo dosaggio è stato valutato utilizzando l'algoritmo 4PL. Metodi di calcolo differenti che utilizzano altri algoritmi devono essere valutati dall'utilizzatore. I campioni con risultato superiore allo standard a concentrazione più elevate (STD5, 640 pmol/l) devono essere diluiti con STD1 o un siero a bassa concentrazione di analita e ridosati. Considerare i fattori di diluizione utilizzati per il calcolo della concentrazione di questi campioni.

Esempio di curva STD tipica:

vedere capitolo *8) CALCULATION OF RESULTS* delle istruzioni d'uso in Inglese.

Il foglio del controllo di qualità (QC) fornito con il kit mostra i risultati al rilascio QC finale per tutti i kit alla data di produzione. Le OD ottenute dai clienti possono essere differenti per varie influenze e/o a causa del normale decremento di intensità del segnale durante la validità del kit. Tuttavia, ciò non influisce sulla validità dei risultati finché si ottiene una OD di 1.50 o superiore per lo STD a concentrazione più elevata e finché il valore del CTRL è compreso nell'intervallo di riferimento (vedere l'etichetta).

9) CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Intervalli di riferimento:	Mediana (siero, n=93): 3.0 pmol/l Ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli di riferimento.
Fattore di conversione da pmol/l a pg/ml	1 pmol/l = 8,475 pg/ml referito a NT-proBNP (1-76) che viene misurato in questo test ELISA
Intervallo di misura:	da 0 a 640 pmol/l
Volume di campione:	50 µl di siero umano
Limite di rivelabilità:	(0 pmol/l + 3 SD) 3 pmol/l
Tempo di incubazione:	3 ore / 30 min

10) PRECISIONE

Esperimento:
Intra-saggio: 2 campioni a concentrazione nota soo stati misurati 3 volte in 1 saggio da 1 operatore.
Inter-saggio: 2 campioni a concentrazione nota sono stati misurati 8 volte in 2 saggi da operatori differenti.

Intra-saggio (n=3)	**Campione 1**	**Campione 2**	**Inter-saggio (n=8)**	**Campione 1**	**Campione 2**
Media (pmol/l)	60.2	35.2	Media (pmol/l)	52.1	108.1
SD (pmol/l)	2.0	0.9	SD (pmol/l)	1.7	7.9
CV (%)	4	3	CV (%)	3	7

11) NOTE TECNICHE

- Non mescolare o sostituire i reagenti con quelli di altri lotti o altra provenienza.
- Non scambiare i tappi di differenti reagenti o tra i vari lotti.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza. Proteggere i reagenti dalla luce solare diretta.
- La soluzione di substrato deve restare incolore fino alla sua aggiunta in micropiastra.
- Per assicurare l'ottenimento di risultati accurati, è necessario che la pellicola autoadesiva sia ben sistemata sui pozzetti della micropiastra durante le incubazioni.

12) PRECAUZIONI

Tutti i componenti del kit di origine umana sono stati misurati contro HIV-Ab e HbsAg, e sono risultati negativi. Tuttavia, tali componenti devono essere manipolati e smaltiti come potenziali materiali infettivi. I reagenti liquidi contengono Proclin 300 ≤0.1% come conservante, il quale non è tossico alle concentrazioni usate in questo kit. Potrebbe causare reazioni allergiche alla cute – evitare il contatto con la cute o gli occhi.

- Non pipettare a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o usare cosmetici nei luoghi ove vengono utilizzati i reagenti.
- Evitare ogni contatto con i reagenti utilizzando i guanti.
- L'acido solforico è irritante per gli occhi e la cute. Sciacquare bene con acqua in caso di contatto.

13) BIBLIOGRAFIA

Vedere capitolo *13) LITERATURE* delle istruzioni d'uso in Inglese.

Notes:

Notes:

Notes:

SYMBOLS

Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza /Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba exspirácie / Doba exspirace

Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití

In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícky materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnicky materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)

Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže

Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno

Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo

Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk …… között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí

Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

SK-1204 NT-proBNP
ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- ❑ Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- ❑ Prepare reagents and samples as instructed.
- ❑ Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- ❑ Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- ❑ Step1) Add 50 µl STD/ SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) in duplicate into respective well.
- ❑ Step 2) Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well. Swirl gently.
- ❑ **Step 3) Cover tightly and incubate for 3 hours at room temperature (18-26°C).**
- ❑ Step 4) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- ❑ Step 5) Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
- ❑ **Step 6) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- ❑ Step 7) Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
- ❑ Step 8) Read Optical Density at 450 nm with reference 630 nm, if available.